

本文引用:范婧莹,刘洁,刘晓丹,戴娜,何兰,王贤文,李丽鹏,邹韵,何迎春.益气解毒方通过 Wnt/ β -catenin 信号通路对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖的影响[J].湖南中医药大学学报,2020,40(5):535-539.

益气解毒方通过 Wnt/ β -catenin 信号通路对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖的影响

范婧莹^{1,2},刘洁^{1,2},刘晓丹¹,戴娜²,何兰^{1,2},王贤文^{2,3},李丽鹏¹,邹韵¹,何迎春^{1,2*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.中医药防治眼耳鼻喉疾病湖南省重点实验室,湖南长沙 410208;

3.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007)

[摘要] **目的** 探讨益气解毒方对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响。**方法** 将 CNE2 细胞用不同浓度 (0.25、0.50、1.0 g/L) 的益气解毒方水提物和阳性对照药 (顺铂, 4 mg/L) 分别处理 24、48、72 h, 采用 MTT 法检测细胞增殖率, 流式细胞术检测药物作用 48 h 后细胞周期分布情况; Western blot 检测 Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白 Wnt5a/b、 β -catenin 及细胞周期蛋白 CyclinD1 的表达情况。**结果** MTT 结果显示, 益气解毒方对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖具有明显抑制作用, 且其抑制作用与作用时间、药物浓度呈正相关 ($P < 0.05$)。细胞周期结果显示, 处理 48 h 后, G_0/G_1 期比例降低, S 期和 G_2/M 期比例增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。Western blot 结果显示, 水提物处理 48 h 后, Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白 Wnt5a/b、 β -catenin 及细胞周期蛋白 CyclinD1 的表达量明显下降 ($P < 0.01$)。**结论** 益气解毒方可通过下调 Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白 Wnt5a/b、 β -catenin 及细胞周期蛋白 CyclinD1 的表达, 阻滞细胞周期, 抑制鼻咽癌 CNE2 细胞的增殖。

[关键词] 益气解毒方; 鼻咽癌; Wnt/ β -catenin 信号通路; 细胞周期; 细胞增殖

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.05.005

Effects of Yiqi Jiedu Formula on Proliferation of Nasopharyngeal Carcinoma CNE2 Cells by Wnt/ β -catenin Signaling Pathway

FAN Jingying^{1,2}, LIU Jie^{1,2}, LIU Xiaodan¹, DAI Na², HE Lan^{1,2}, WANG Xianwen^{2,3}, LI Lipeng¹, ZOU Yun¹, HE Yingchun^{1,2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Provincial Key Laboratory for the Prevention and Treatment of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases with Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. The First Affiliated of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effects of Yiqi Jiedu Formula (YQ) on proliferation of CNE2 cells and Wnt/ β -catenin signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma. **Methods** CNE2 cells were respectively treated with different concentrations (0.25, 0.50, 1.0 g/L) of YQ water extract and positive control medicine (cisplatin, 4 mg/L) for 24, 48, and 72 h. Then cell proliferation rate activity was detected by MTT method and the cell cycle distribution after 48 h was detected by flow cytometry. Western blot method was used to detect the expression levels of key proteins Wnt5a/b, β -catenin and CyclinD1 in Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Results** MTT results showed that YQ group had significant inhibitory effect on the proliferation of nasopharyngeal

[收稿日期] 2019-11-21

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81573721, 81874408, 81973914); 湖南省自然科学基金 (2019JJ40216); 湖南省教育厅科研基金项目 (16C1212); 2018 年湖南中医药大学校级大学生研究性学习和创新性实验计划课题 (2018-072)。

[作者简介] 范婧莹, 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 中西医结合防治头颈肿瘤疾病研究。

[通讯作者] * 何迎春, 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: yingchunhe@aliyun.com。

carcinoma CNE2 cells, and the inhibitory effect was positively correlated with the time and medicine concentration ($P<0.05$). The results of cell cycle showed that after 48 h of treatment, the proportion of G_0/G_1 was decreased, and the proportion of S and G_2/M was increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Western blot results showed that after 48 h of water extraction treatment, the expression levels of Wnt/ β -catenin signaling pathway related protein Wnt5a/b, β -catenin and CyclinD1 decreased significantly ($P<0.01$). **Conclusion** YQ could inhibit the proliferation of human nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells and block cell cycle by down-regulating the expression of Wnt/ β -catenin signaling pathway key proteins Wnt5a/b, β -catenin and CyclinD1.

[**Keywords**] Yiqi Jiedu Formula; nasopharyngeal carcinoma; Wnt/ β -catenin signaling pathway; cell cycle; cell proliferation

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)源于鼻咽上皮,是头颈部最常见的恶性肿瘤之一,我国南方地区高发^[1]。目前,鼻咽癌的主要治疗方法为放疗和化疗相结合的综合治疗,鼻咽癌的局部控制得到明显提高,但放、化疗有其固有的局限性,如不良反应大、敏感性降低、复发甚至转移等^[2]。因此,选择合理有效的治疗方法对减少治疗不良反应及提高鼻咽癌患者的生存率和生活质量有重要的意义^[3]。田道法教授综合古今医学对鼻咽癌发病机制的认识,确立了“益气解毒”治法,并创立益气解毒方^[4]。多年临床实践证实,益气解毒方(以下简称YQ)可明显减轻放疗化疗所带来的不良反应^[5]。Wnt/ β -catenin信号通路在细胞的生长发育、增殖、分化和凋亡中发挥重要作用,该信号通路的异常与包括人类鼻咽癌在内的许多恶性肿瘤的发生、发展密切相关^[6]。本研究以人鼻咽癌细胞株CNE2为研究对象,探讨益气解毒方对CNE2细胞增殖及Wnt/ β -catenin信号通路的影响。

1 材料

1.1 细胞株

人鼻咽癌细胞CNE2(低分化)购于北京北纳创联生物技术研究院细胞库。

1.2 药物

益气解毒方药物组成:黄芪30g,茯苓15g,党参15g,天花粉10g,黄连10g,白花蛇舌草10g,甘草6g,购自湖南中医药大学第一附属医院中药房。水提物具体制备方法参考本课题组前期研究^[7],密封保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

注射用顺铂Cisplatin(货号:P4394-25MG, Sigma公司)。

1.3 主要试剂及仪器

RPMI-1640培养基(Hyclone公司);细胞周期检

测试剂盒(联科生物公司);兔抗鼠Wnt5a/b单克隆抗体、兔抗鼠 β -catenin单克隆抗体、兔抗鼠CyclinD1单克隆抗体、鼠抗兔 β -actin单克隆抗体(CST公司);胎牛血清(Gibco公司);二甲基亚砜(AMRESCO公司);彩虹180广谱蛋白Marker(Solarbio公司);R Dye 800CW山羊抗兔荧光二抗、R Dye 680CW山羊抗小鼠荧光二抗(LLCOR公司)。SW-CJ-2FD双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司);倒置显微镜(日本Olympus公司);Odyssey CLX荧光扫描成像系统(基因有限公司);贺利氏HERAcell 150i系列 CO_2 培养箱(赛默飞世尔公司);Guava easyCyte HT流式细胞仪(德国默克密理博);ELX800全自动酶标分析仪(BioTek公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

将CNE2细胞置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、含 $5\%\text{CO}_2$ 的恒温培养箱中培养,隔天换培养液,常规传代,将含 10% 胎牛血清的RPMI-1640作为培养基。取对数生长期细胞用于后续实验。

2.2 MTT法检测细胞增殖

取对数生长期细胞,胰蛋白酶消化,重悬成细胞悬液,调整细胞密度为 $3\times 10^4\sim 5\times 10^4$ 个/mL,种于96孔板(每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$)。过夜,将CNE2细胞分为5组:对照组(Control组)、不同浓度益气解毒方水提物(YQ组,0.25、0.50、1.0 g/L)、阳性对照顺铂组(Cisplatin组,4 mg/L),每组设置5个复孔,Control组每孔加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 细胞培养液,药物组每孔加入不同浓度的含药培养液 $200\text{ }\mu\text{L}$ 。除此,设定空白孔(用于OD值校正)。处理24、48、72 h后,每孔(包含空白孔)加入MTT溶液 $100\text{ }\mu\text{L}$,4 h后,弃上清液,加入二甲基亚砜 $150\text{ }\mu\text{L}$ /孔。用酶标仪检测490 nm波长处的吸光度值(A),计算细胞的增殖率。

细胞增殖率 $=\frac{(A_{\text{实验组}}-A_{\text{空白孔}})}{(A_{\text{Control组}}-A_{\text{空白孔}})}\times 100\%$

2.3 流式细胞仪检测各组细胞的周期

实验分组同“2.2”,不同浓度药物处理 CNE2 细胞 48 h 后,用胰酶消化各组细胞,重悬成细胞悬液,离心收集细胞,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL,加入 70%冰乙醇 1.0 mL 混匀固定, -20°C 过夜。检测时,离心弃乙醇,PBS 洗 3 次,经 PI 染色液染色后,流式细胞仪检测各组细胞的周期,计算处于 G_0/G_1 期、S 期和 G_2/M 期的细胞所占比例。

2.4 Western blot 法检测蛋白表达

根据“2.2”项的结果确定水提物处理 CNE2 细胞的时间,待 CNE2 细胞生长至 70%~80%,向培养皿中加入不同浓度 YQ 组 (0.25、0.50、1.0 g/L) 和 Cisplatin 组 (4 mg/L) 各加入含药培养液 3 mL, Control 组加入细胞培养液 3 mL。处理 48 h 后冰上提取蛋白,用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度,根据蛋白浓度确定上样量。点样,10% SDS-PAGE 电泳分离,之后 200 mA 冰上转膜 2 h,室温封闭 1 h,加一抗(稀释浓度 1:1 000) 4°C 孵育过夜。次日, TBST 洗膜 3 次,加荧光二抗(稀释浓度 1:20 000),避光孵育 1 h,洗膜,用 Odyssey CLX 双色红外荧光扫描成像系统分析蛋白表达。检测蛋白指标有 β -catenin、Wnt5a/b、CyclinD1、 β -actin。

2.5 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,所有数据均以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,符合正态性以及方差齐性使用单因素方差分析,如不满足,则行秩和检验。 $P < 0.05$ 时判定差异具有统计学意义。并用 Graph Pad Prism 6.0 软件制作所有结果分析图。

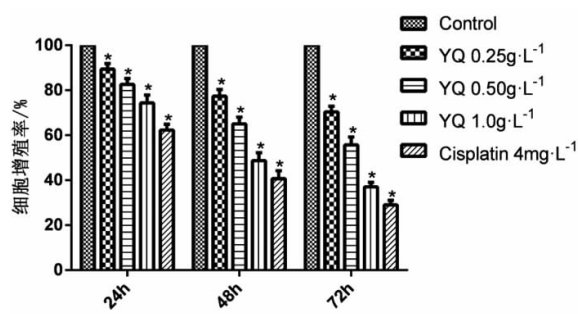
3 结果

3.1 MTT 法检测益气解毒方对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖的影响

MTT 结果显示,与 Control 组比较,不同浓度 YQ 组 (0.25、0.50、1.0 g/L) 和 Cis 组 (4 mg/L) 分别处理 CNE2 细胞 24、48、72 h 后,对 CNE2 细胞增殖具有明显抑制作用,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$),且其抑制作用与作用时间、药物浓度呈正相关。见图 1。

3.2 益气解毒方对鼻咽癌 CNE2 细胞周期的影响

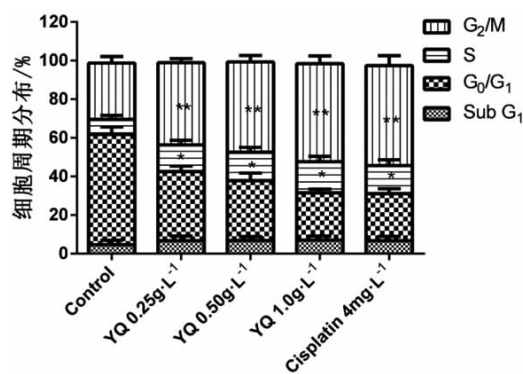
流式细胞术检测细胞周期结果显示,与 Control 组比较,不同浓度益气解毒方水提物处理 CNE2 细胞 48 h 后,随着水提物浓度增加,细胞所占 G_0/G_1



注:同时间点与 Control 组比较, * $P < 0.05$

图 1 MTT 法检测益气解毒方对人鼻咽癌 CNE2 细胞增殖的影响

期比例降低;S 期和 G_2/M 期比例增加;差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),主要阻滞细胞周期于 G_2/M 期。见图 2。



注:与 Control 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

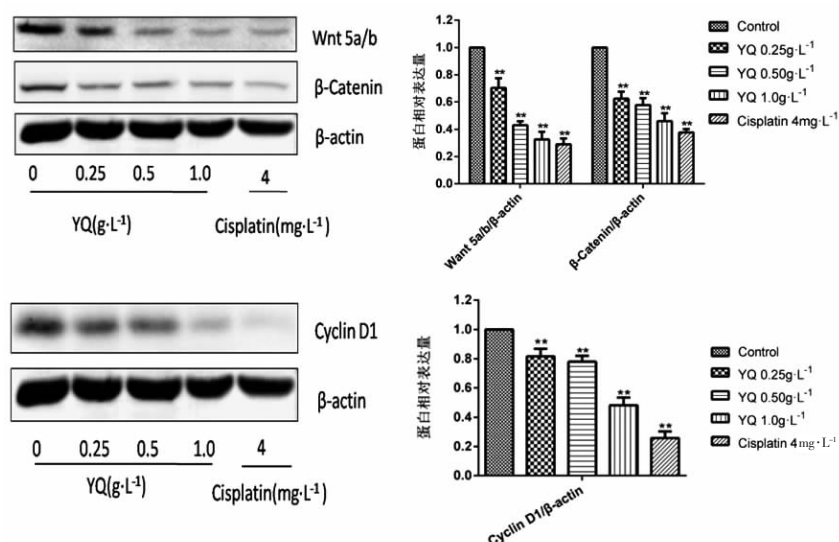
图 2 益气解毒方对鼻咽癌 CNE2 细胞周期的影响

3.3 益气解毒方对鼻咽癌 CNE2 细胞周期相关蛋白及 Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白表达的影响

Western blot 法检测 Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白 Wnt5a/b、 β -catenin 及细胞周期蛋白 CyclinD1 的表达水平,结果显示:经益气解毒方水提物处理 48 h 后,与 Control 组比较,CNE2 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白 Wnt5a/b、 β -catenin 及细胞周期蛋白 CyclinD1 的表达量明显下降,且具有一定浓度依赖性,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 3。

4 讨论

鼻咽癌是最常见的头颈部恶性肿瘤之一,其发病具有种族易感性与地域集中性,病因可能与遗传、环境、EB 病毒感染等因素有关^[8-9]。以放疗和化疗相结合的综合治疗是目前治疗鼻咽癌的主要方法,但患者在治疗后多易复发,且存在放疗不敏感、化疗耐



注:与 Control 组比较,** $P < 0.01$

图3 益气解毒方对人鼻咽癌 CNE2 细胞周期相关蛋白及 Wnt/ β -catenin 信号通路关键蛋白表达的影响

药等不良反应。因此,如何有效减轻不良反应、降低复发率是目前临床治疗中面临的难题。益气解毒方由黄芪、党参、天花粉、黄连、白花蛇舌草、茯苓、甘草组成,该方是田道法教授多年的经验用方,具有扶正祛邪、益气解毒、生津润燥之功效。多年临床观察和实验研究显示,益气解毒方联合同期的放化疗可明显减轻放化疗后不良反应,提高鼻咽癌患者的免疫力和生存率^[10-11]。

本研究通过 MTT 法检测发现,益气解毒方对人鼻咽癌 CNE2 细胞增殖具有明显抑制作用,且其抑制作用与作用时间、药物浓度呈正相关。肿瘤的发生与细胞周期失控密切相关,细胞周期调控涉及多种信号级联传导机制,当对关键“检查点” G_1 期、S期或 G_2 期等干扰时将导致肿瘤细胞分裂失控和过度增殖^[12-13]。本研究通过流式细胞术检测发现,益气解毒方可以使 S 期和 G_2/M 期的细胞比例增多,主要阻滞细胞周期于 G_2/M 期。目前研究发现,中药有效成分主要通过影响周期蛋白、细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)等来影响细胞周期蛋白(Cyclin)-CDK 复合物,或通过诱发 DNA 损伤、有丝分裂缺陷和胞质分裂失败等使肿瘤细胞阻滞于 G_2/M 期,从而抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡^[14]。周程^[15]通过研究发现石蒜碱可下调细胞周期相关蛋白 CyclinD1 的表达,将细胞周期阻滞在 G_2/M 期,并且抑制 c-myc 的表达,诱导细胞凋亡,抑制前列腺癌细胞增殖。Wnt/ β -catenin 信号通路是目前公认的与肿瘤细胞

的发生、发展密切相关的信号通路,其中 β -catenin 起关键作用^[16]。当 Wnt/ β -catenin 信号通路被激活后, GSK3p/APC/Axin 复合物的形成被抑制,细胞质中游离的 β -catenin 蛋白含量增多,过量的 β -catenin 入胞核^[17-19],激活下游众多靶基因的表达,其中包括 CyclinD1、c-myc 等,从而导致肿瘤细胞增殖、侵袭和转移^[20]。CyclinD1 作为 Wnt 信号通路的下游靶基因,同时又是细胞周期蛋白家族的一员,现已证实,肿瘤细胞异常增殖与 CyclinD1 的过度表达并伴随 CDK 活性的失调相关^[21]。本研究通过 Western blot 法检测发现,益气解毒方可以明显下调 CNE2 细胞中 Wnt5a/b、 β -catenin 和 CyclinD1 的蛋白表达水平,且具有一定浓度依赖性,提示益气解毒方可通过下调 Wnt5a/b、 β -catenin 和 CyclinD1 的蛋白表达,阻滞细胞周期,抑制鼻咽癌 CNE2 细胞增殖。

综上所述,本实验初步说明益气解毒方可通过调节 Wnt/ β -catenin 信号通路阻滞细胞周期,抑制鼻咽癌 CNE2 细胞增殖,且其抑制作用可能与诱导并促进凋亡相关,具体机制有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] ZHANG L F, LI Y H, XIE S H, et al. Incidence trend of nasopharyngeal carcinoma from 1987 to 2011 in Sihui County, Guangdong Province, South China: an age-period-cohort analysis[J]. Chinese Journal of Cancer, 2015, 34(8):350-357.
- [2] KONG F, CAI B, LIN S, et al. Assessment of radiotherapy combined with adjuvant chemotherapy in the treatment of patients

- with advanced nasopharyngeal carcinoma: a prospective study[J]. Journal of BUON, 2015,20(1):206-211.
- [3] 张 力.鼻咽癌的综合治疗进展[J].肿瘤防治研究,2019,46(8):667-671.
- [4] 胡 晶,刘 洁,徐冰雁,等.益气解毒方对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(8):943-947.
- [5] 田道法,何迎春.鼻咽癌前病变“气虚染毒”病机理论研究[J].中医耳鼻喉科学研究,2008,7(1):24-29.
- [6] 范家铭.Wnt/ β -catenin 信号转导通路在人参多糖诱导人鼻咽癌细胞凋亡中所起作用的实验研究[D].重庆:重庆医科大学,2014.
- [7] 廖 雪,蔺 婷,罗晶婧,等.益气解毒方水提物对 RAW_{264.7} 细胞免疫功能的影响[J].肿瘤基础与临床,2015,28(6):473-476.
- [8] LIU Z, CHANG E T, LIU Q, et al. Quantification of familial risk of nasopharyngeal carcinoma in a high incidence area[J]. Cancer, 2017, 123(14): 2716-2725.
- [9] BAIZIG N M, MORAND P, SEIGNEURIN J M, et al. Complementary determination of Epstein Barrvirus DNA load and serum markers for nasopharyngeal carcinoma screening and early detection in individuals at risk in Tunisia[J]. European Archives of Oto-rhino-laryngology, 2012,269(3): 1005-1011.
- [10] 胡 梅,田道法,刘群良,等.益气解毒方提取物对 CNE2 细胞的体内外抑瘤作用[J].中国中医药信息杂志,2012,19(11):41-43.
- [11] 穆光锐.益气解毒方联合同期放疗对局部晚期鼻咽癌患者 T 淋巴细胞亚群及生存率的影响[J].现代中西医结合杂志,2016,25(24):2701-2703.
- [12] TOPALIAN S L, TAUBE J M, ANDERS R A. Pardoll DM Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy[J]. Nature Reviews Cancer,2016,16(5):275-287.
- [13] DALTON S. Linking the cell cycle to cell fate decisions[J]. Trends in Cell Biology, 2015,25(10):592-600.
- [14] 于 森,付叶珊,王 冰,等.中药有效成分对肿瘤细胞 G2/M 期调控的研究进展[J].中草药,2019,50(15):3707-3713.
- [15] 周 程.基于 NF- κ B 信号通路探索石蒜碱抗前列腺癌机理[D].兰州:兰州大学,2016.
- [16] 涂雪松,胡利霞,瞿广桥,等.紫杉醇通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制鼻咽癌细胞增殖的实验研究[J].癌症进展,2016,14(12):1216-1220.
- [17] DONG B, LEE J S, PARK Y Y, et al. Activating CAR and β -catenin induces uncontrolled liver growth and tumorigenesis[J]. Nature Communications, 2015,6:5944.
- [18] 李月雅,李 凯.Wnt/ β -catenin 信号通路对肿瘤干细胞作用的研究进展[J].山东医药,2016,56(9):98-100.
- [19] 余 莹,胡 玲.中医药靶向干预 Wnt/ β -catenin 信号通路治疗胃癌的研究进展[J].南京中医药大学学报,2019,35(4):471-476.
- [20] 罗晶婧.益气解毒方水提物联合盐霉素抑制鼻咽癌细胞增殖、迁移和诱导凋亡的效应[D].长沙:湖南中医药大学,2016.
- [21] YUDHANI R D, ASTUTI I, MUSTOFAM, et al. Metformin Modulates Cyclin D1 and P53 Expression to Inhibit Cell Proliferation and to Induce Apoptosis in Cervical Cancer Cell Lines[J]. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention, 2019,20(6):1667-1673.

(本文编辑 苏 维)